动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 304−313 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03304

文昌鱼 GFP 基因的鉴定及表达分析

徐 炜, 李伟业, 王义权*

（厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005）

摘要：近年在隶属头索动物亚门的文昌鱼体内发现有内源性绿色荧光蛋白存在，并发现文昌鱼荧光蛋白的发光现象在不同发育时期以及个体间有较大的差异。为了进一步揭示 GFP 基因在文昌鱼中的进化模式，探索其可能执行的功能, 该文首先对白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*）GFP 基因作了全面鉴定，并对其不同发育阶段胚胎及成体不同区域中的荧光信号进行了实时观察记录，进而对 GFP 基因在绿色荧光表达强烈的两个特定时期做了绝对定量检测。研究结果表明，文昌鱼基因组中至少有 12 个内源性 GFP 基因, 在个体发育的不同时期，内源性荧光出现的位置有所变化, 而且在变态后的个体之间出现荧光的情况差异较大, 荧光蛋白基因的表达由多个 GFP 同源基因共同参与, 这些基因在不同的发育时期表达量有较大的差异, 提示不同的 GFP 基因在特定发育阶段可能行使各自的功能。

关键词：文昌鱼; GFP; 基因克隆; 表达
中图分类号：Q959.287; Q344.13; Q951 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0304-10

Identification and expressional analysis of green fluorescent protein genes in amphioxus

XU Wei, Li Wei-Ye, WANG Yi-Quan*

(*School of Life Sciences*, *Xiamen University*, *Xiamen* 361005, *China*)

Abstract: Endogenous green fluorescent proteins (GFPs) have recently been found in amphioxus, where different characteristics of light production in different development stages and between different individuals have manifested. We identified the GFP genes in an amphioxus species *Branchiostoma belcheri* and monitored real time fluorescence signals of GFPs during different developmental stages to provide an insight on the GFP function in amphioxus. We found there are at least 12 endogenous GFP genes in amphioxus genome, and fluorescent expression changes in body position during different developmental stages. Additionally, GFP expression after metamorphosis development differed significantly among different amphioxus individuals, suggesting that there are multiple GFP homologous genes responsible for fluorescent expression. Expression levels of these genes varied significantly during different developmental stages, indicating that different GFP genes may have their unique functions in the development of amphioxus during specific phases of growth.

Key words: Amphioxus; GFP; Gene clone; Expressional

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)作为常用的分子标记蛋白已广泛应用于细胞生物学、发育生物学、分子生物学等生物学研究的各个领域, 尤其在 2008 年诺贝尔化学奖授予在 GFP 技术上有突出贡献的三位科学家后, GFP 越来越为大家所熟知。当前对 GFP 基因家族的研究一方面集中在化学家对 GFP 的改造优化和拓展它们的应用领域, 通过对发色基团形成分子机制的探索, 改变其在生化和光谱学上的性质以及适用的灵敏度和范围, 改造出增强型的荧光蛋白衍生物用来作为分子标记, 进一步加深人们对绿色荧光蛋白家族的结构与功能间相互关系的认识; 另一方面进化生物学家和海洋生物学家则积极探索自然界存的尚未发现的荧光蛋白家族新成员以及有内源荧光蛋白的物

收稿日期：2012-01-11；接受日期：2012-04-10
基金项目：国家自然科学基金项目(30830023；31071110)
*通信作者(Corresponding author)，王义权(1957 一), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向：动物分子遗传与进化。E-mail: wangyq@xmu.edu.cn

种，对新发现荧光蛋白家族的成员进行系统发育分析，期待能够对 GFP 基因家族的起源进化以及生理功能作进一步预测，从而加深对 GFP 生物学功能的了解。

GFP 最早是 Shimomura et al (1962)在研究太平洋维多利亚水母(*Aequoreavitofia*)的荧光素酶时意外发现的一种能够自发释放出生物荧光的蛋白质。Morise et al (1974)纯化了该蛋白质。在水母中分离得到的这种 GFP 是由 238 个氨基酸组成的一种单体蛋白质，其中 GFP 荧光的产生主要归功于其分子内 65～67 位(SYG)的三个氨基酸所形成的生色团。随后的研究发现，GFP 的晶体结构显示蛋白质中央是一个水桶样结构，由 11 个围绕中心 α 螺旋的反平行 β 折叠组成的一个完整结构，这个桶状结构的完整性是 GFP 产生荧光的前提条件。GFP 家族的成员其生色/荧光基团的形成完全是由多肽链序列本身决定，其成熟以及荧光发射除了氧气外，都不需要其他任何辅助因子 (Ormö et al,1996; Tsien, 1998; Yang et al,1996; Zimmer, 2002)。自从 1992 年 Douglas Prasher 在水母中克隆得到第一个 GFP 基因 *av*GFP 后，许多新的 GFP 基因也陆续在其他物种得到克隆(Chalfie et al, 1994; Gurskaya et al, 2003; Labas et al, 2002; Matz et al, 1999; Shagin et al, 2004)。这些 GFP 基因主要来自后生动物的两大类：刺细胞动物(Cnidarians)和桡足类(Copepods)，而在已经测序的其他后生动物中却尚未找到 GFP 基因。

Deheyn et al (2007)在头索动物佛罗里达文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)中发现一个 GFP 基因，而且在这个物种胚胎发育的各个时期及成体中都发现了绿色荧光蛋白表达。随后进一步的系统发育分析暗示，文昌鱼 GFP 的起源符合先前关于两侧对称动物的荧光蛋白是从单一的后生动物祖先的荧光蛋白进化而来的推测，而不是独立源于后口动物的 G2FP 基元蛋白(Shagin et al, 2004)。目前在 RCSB 蛋白数据库中已收集的 27 个物种中发现有 266 个 GFP 基因家族的成员。该数据库对这些基因的空间结构等方面有详细的描述，人们对这些 GFP 基因进行了系统分析，并对 GFP 的功能作了一些推测；但很遗憾，RCSB 数据库中没有包含头索动物文昌鱼的 GFP 基因数据(Ong et al, 2011)，而文昌鱼作为发现内源 GFP 蛋白的最高等生物类群，对其 GFP 的研究有着重要意义。作为隶属脊索动物门(Chordata)头索动物亚门(Cephalochordata)的文昌鱼，在进化上占有极其重要的地位，是介于无脊椎动物和脊椎动物之间的过渡类型 (Holland et al, 2004)。由于文昌鱼本身具有结构简单、个体小、躯体透明、体外受精发育，以及其基因组排布与脊椎动物基因组的同线性程度高，且具有较少重复,使它成为一种非常理想的模式生物，已经越来越多地被人们应用于进化发育生物学和比较与功能基因组学等方面的研究 (Theodosiou et al, 2011) 。得益于文昌鱼实验室繁殖成功（Wang et al，2006），我们可以对白氏文昌鱼 GFP 基因进行鉴定和克隆，并对绿色荧光表达较强烈的口笠触须和胚胎时期的 GFP 基因表达进行绝对定量检测，结合体视镜观察文昌鱼不同发育时期的荧光蛋白表达，以期找出 GFP 基因在不同时期和位置表达上的差异，从而为进一步了解文昌鱼 GFP 功能作一些预测。此外，文昌鱼作为一种新兴的模式生物，在以后的研究中 GFP 很可能作为报告基因用来研究外源基因表达和功能。然而，文昌鱼中存在着大量的内源性 GFP 基因，这样就很有可能影响绿色荧光蛋白报告基因的使用，因此，对于文昌鱼内源性 GFP 的表达规律和光谱学等一系列特性的了解，有助于我们更好地选择合适的荧光蛋白报告基因进行以后的研究工作。

1　材料和方法

1.1　白氏文昌鱼的成体以及胚胎收集

本实验采用厦门产白氏文昌鱼(*Branchiostoma becheri*)的成体和胚胎作为材料(Zhang et al, 2006)，文昌鱼亲鱼于 2009 年 3 月采集自厦门欧厝和黄厝海滩，经一年饲养，通过控制合适的光照使其正常产卵，在 2010 年 6 月中旬到 8 月的文昌鱼产卵季节分别收集文昌鱼的胚胎，于 Trizol 中研磨，随后将样品分装再冻存于−80 ℃备用。用 OLMPUS 荧光体视镜对白氏文昌鱼成体进行观察，以找出在头部口笠处绿色荧光表达强烈的个体，将其口笠切下保存到 Trizol 中。此外，对白氏文昌胚胎发育过程观察发现，神经胚出膜后 6～8 体节，胚胎开始出现较强的绿色荧光。

1.2　RNA 提取和反转录

对解剖所得口笠组织以及出膜后 6～8 体节的 Trizol 样品，进行 RNA 抽提，方法参照动物组织 Trizol 样品的 RNA 提取方法，得到的总 RNA 用 DNase (TAKARA 公司)处理，去除可能残存在的基因组 DNA 污染，避免其对以后 qPCR 实验结果的影

响。所得 RNA 经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性，再用微量分光光度计测定 A_{260} 和 A_{280} 值，检测 RNA 的纯度，并计算浓度，所得 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8～2.0。最后使用反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO 公司)将提取的 RNA 进行反转录合成 cDNA，用于后期的 qPCR 分析实验。

1.3　白氏文昌鱼 GFP 基因的鉴定

我们筛选得到的文昌鱼 GFP 序列来自白氏文昌鱼基因组数据库。使用的方法是：将已报道的佛罗里达文昌鱼的 GFP 蛋白序列作饵(Li et al, 2009)，用 blast 方法中的 tBlastn 程序(E-value=1 e^{-5}) (Altschul et al, 1990)将所有白氏文昌鱼的 GFP 基因从基因组中定位出来，通过在线软件 mVISTA (网站 http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml)预测未注释基因的 cDNA 序列。再比较每个注释 GFP 基因 CDS 上下游各 3 000 bp 的基因组序列差异来校正，从而确定所注释的基因是否为等位基因。

1.4　GFP 基因的克隆

通过 MEGA4.1 对所得到的 GFP 基因序列进行比对，根据比对结果设计特异性引物，对 GFP 基因完整蛋白编码区的 cDNA 序列进行扩增。扩增所得的 PCR 产物通过电泳检测，对在 650～850 bp 的条带进行切胶回收，回收的片段连接到 PGEM-T easy 载体(Promega 公司)，转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞克隆。将得到的阳性克隆送到华大基因公司测序，测序结果用 BIO-EDIT 和 DNA-STAR 软件进行分析，将测序所得到的序列在 GenBank 中比对，随后将那些确定的 GFP 基因序列与基因组数据库中预测到的 GFP 基因的编码序列再次进行比对验证。

1.5　GFP 基因实时荧光定量 PCR 引物设计及特异性检验

测序所得到的白氏文昌鱼 GFP 蛋白编码区序列，用 MEGA4.1 比对，在各个 GFP 间序列差异度较大的位置设计每个基因特异的 qPCR 的引物，以排除不同 GFP 基因间的相互干扰而影响实验结果。然后依次以含有不同 GFP 基因的重组质粒为模板，进行 PCR 扩增，扩增产物经 1.0%琼脂糖电泳来检测 qPCR 引物的特异性，从而避免不同的 GFP 基因在试验中出现交叉反应，影响绝对定量结果。

1.6　荧光定量 PCR 标准曲线的建立及重现性检测

将经验证含有不同 GFP 基因序列的阳性克隆，加入 4 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中 37 ℃，180 r/min 摇床过夜，提取重组质粒，用微量紫外分光光度计测定所提取质粒的吸光度(A_{260} 和 A_{280} 值)，以此计算提取的质粒浓度和判断质粒纯度。再根据摩尔定律，计算质粒中的 DNA 拷贝数。以标准质粒的 10^8 拷贝往下依次 10 倍梯度稀释至 10^2 拷贝为绝对定量模板，得到 7 个浓度梯度，然后进行荧光定量 PCR。在每次实验过程中同时设置无模板的阴性对照，每个样品重复 3 次，反应在 Qiagen 公司的 Rotor-Gene 6000 定量 PCR 仪上进行，qPCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳进行验证，以确保实验的准确性。荧光定量 PCR 反应结束后制作溶解曲线，阈值设置选择曲线指数扩增的线性阶段且精度最大敏感性最大的区域，建立标准曲线(Giulietti et al, 2001)。

1.7　文昌鱼生长发育过程中的荧光观察

在产卵季节收集文昌鱼的卵细胞和受精卵分别放入直径 30 mm 的培养皿中，用 Olympus 荧光体视镜观察记录不同批次文昌鱼的受精卵发育过程的绿色荧光，同样观察成体不同组织或器官的绿色荧光的变化，从而找出绿色荧光蛋白在文昌鱼发育阶段的表达规律，加深了解文昌鱼体内绿色荧光蛋白表达谱的变化。在对文昌鱼胚胎从受精卵发育到 36 h 幼体的发育过程中，分 3 个不同的批次进行观察，每次观察超过 50 枚胚胎，分别在白光和绿色荧光的情况下对胚胎进行拍照，拍摄间隔为 30 min，然后保存图片。对于 36 h 幼体到 10 d 幼体，则是每天 1 次，每次观察拍摄的数量不少于 5 尾，对于 10 d 后的幼体则每 5 天 1 次直到幼体完成变态，进行观察记录。变态完全的幼体，每 15 天观察记录 1 次，而成体文昌鱼的荧光情况是分 3 批在不同时间统计 50 条文昌鱼的荧光表达情况来进行分析。

2　结　果

2.1　白氏文昌鱼 GFP 基因的鉴定克隆

通过用 Bf-GFP 的蛋白序列为饵在白氏文昌鱼基因组数据库中使用 tBlastn 方法获得 24 个与 GFP 基因相关的序列和片段的 scaffold，然后用 mVISTA 等软件预测这些 scaffold 中的 GFP 基因，通过对所得 GFP 基因上下游序列进行分析，人工校正预测结果，得到 12 个有功能的 GFP 基因的全长 CDS 序列。经过鉴定的 12 个 GFP 基因分布在 8 个 scaffold 上，其中 4 个 scaffold 上都存在着 2 个 GFP 基因，这些

基因所占据的区域最大不超过 5 kb，一般都在 3 kb 左右。每个 GFP 基因都含有 6～7 个外显子和 5～6 个内含子，它的编码区长度在 651～666 bp 之间，编码 217～222 个氨基酸，与在桡足类发现的 GFP 基因大小较为一致，但却比在水母中发现的 GFP 基因的长度要略微短一些。这些基因大小的变化都在编码区的第 3 和第 6 个外显子中，差异在 3～12 bp 之间不等，这与 Li et al（2009）对佛罗里达文昌鱼 GFP 基因结构和蛋白长度保守的分析的结果是一致的。依据鉴定得到的 GFP 基因序列设计特异引物，以文昌鱼不同发育时期的 cDNA 为模板，用 RT-PCR 的方法，扩增得到其中 10 个 GFP 基因的蛋白编码区全长序列(除了 *Bb-GFP11* 和 *Bb-GFP12*)，并将其用于文昌鱼 GFP 基因的表达量分析。由于目前对文昌鱼 GFP 基因还没有统一的命名规则，我们选择 Li et al (2009)使用的命名方法对白氏文昌鱼 GFP 基因进行命名。在随后的蛋白序列比对和系统进化分析中，采用的 Bf、Bj、Bl 的 GFP 蛋白序列都来自 Li et al (2009)分析头索动物 GFP 蛋白进化中所使用的蛋白序列。我们比对分析了现有文昌鱼 GFP 蛋白的序列(图 1)，发现它们蛋白序列保守性很强，文昌鱼 GFP 大多具有完全相同的发色基团，即甘氨酸-酪氨酸-甘氨酸。

2.2　文昌鱼 GFP 基因的进化关系

为了了解 4 种文昌鱼 GFP 基因的进化关系，同时对比有全基因组数据库支持的两种文昌鱼 *B. floride* 和 *B. becheri* GFP 基因家族在进化上的差异，我们以桡足类和刺胞类 GFP 基因作为外群，结合所有已知文昌鱼 GFP 的蛋白序列构建了 NJ 树（图 2)(Saitou & Nei, 1987)。系统进化树显示文昌鱼 GFP 基因可以分成不同的 6 簇(自展值分别为 99、100、97、100、100、100)，不同簇中的 GFP 基因的数目也不一样。所有佛罗里达文昌鱼的 14 个 GFP 基因分布在 5 个簇里(除了 clade5)；欧洲文昌鱼的 6 个 GFP 基因全部位于簇 1；日本文昌鱼的 3 个 GFP 基因则分布在 3 个簇中(clade1，clade2，clade5)；而白氏文昌鱼的 12 个 GFP 基因分布在 5 个簇里(除了 clade4)。在进化树中我们发现欧洲文昌鱼没有能与其他 3 种文昌鱼 GFP 基因形成可靠的直系同源关系，而对其他 3 种文昌鱼的直系同源关系分析也仅在簇 1(*Bf-GFP7*、*Bb-GFP7* 和 *Bj-GFP7*)，簇 2(*Bf-GFP9*、*Bb-GFP9* 和 *Bj-GFP9*)和簇 3(*Bf-GFP10* 和 *Bb-GFP10*)中看到有 3 对 GFP 基因具有可靠的直系同源关系，而其他的 GFP 基因则也没有与簇里的基因形成可靠的直系同源关系。

在进化树中可以很明显地看到两种有完整基因组数据库支持的文昌鱼 *B. floride* 和 *B. becheri* 的 GFP 基因不仅数量存在差异，而且在分布上也有差别，这两种文昌鱼的 GFP 基因都只分布于其中的 5 簇中。在不同的簇之间，Bb-GFP 和 Bf-GFP 之间的数目也是不尽相同的。另外，*B. floride* 和 *B. becheri* 各有 1 簇自己特有的 GFP 基因。*B. becheri* 特有的 GFP-clade5 只有 1 个基因，该基因在两种西太平洋文昌鱼中均存在，但在 *B. floride* 则没有发现。 *B. floride* 的 GFP-clade4 基因的数量高达 3 个，但在 *B. becheri* 中则没有这簇基因。以上对 *B. floride* 和 *B. becheri* 的 GFP 基因分析的结果暗示，不同种文昌鱼含有的 GFP 基因数量不同，并不是每种文昌鱼都含有完整的 6 簇 GFP 基因,；不同种文昌鱼在各簇中的 GFP 基因数目也不完全相同。这些可能与文昌鱼分化以后，各自在所处的生活环境中承受的选择压力差异有关。

2.3　文昌鱼 GFP 基因实时引物的特异性检测

由于文昌鱼 GFP 基因可能由独立的一个祖先基因倍增而来，通过 Sequencher 4.2 对其进行序列比对，发现它们的 CDS 序列相似度较高，有的基因间相似度在 98%以上(如 *Bb-GFP 5* 和 *Bb-GFP 6*)，因此，需要我们在设计 GFP 基因的 qPCR 引物时进行引物的特异性检测，尤其注重那些隶属于同一簇内且序列相似度极高的 GFP 引物检测。在 Bb-GFP 基因家族中，Bb-clade1 亚家族和 Bb-clade3 亚家族含有较多基因，而且基因间序列相似度较高。从 Bb-clade1 亚家族中克隆到 4 个基因的全长编码区序列，Bb-clade3 亚家族中的克隆到 3 个基因(除了 *Bb-GFP12*)。对扩增这 7 个基因的引物特异性进行检测，结果显示这 7 对引物特异性较好，没有在含有其它 GFP 全长序列的质粒中出现引物间的非特异性扩增，这就避免了特异引物间的交叉反应，确保后期 qPCR 实验结果的准确性。

2.4　荧光定量 PCR 标准曲线及可重复性检测

用带有目的片段全长序列的质粒稀释样品作为各组定量实验标准品，荧光定量 PCR 后，根据标准曲线法设定阈值，取线性关系良好的加样孔，用 Rotor 6000 荧光定量 PCR 仪上自带的绘图软件绘制标准曲线。根据图像显示 SYBR Green I PCR 标准曲线的阈值和模板的浓度显示很好的线性关系，

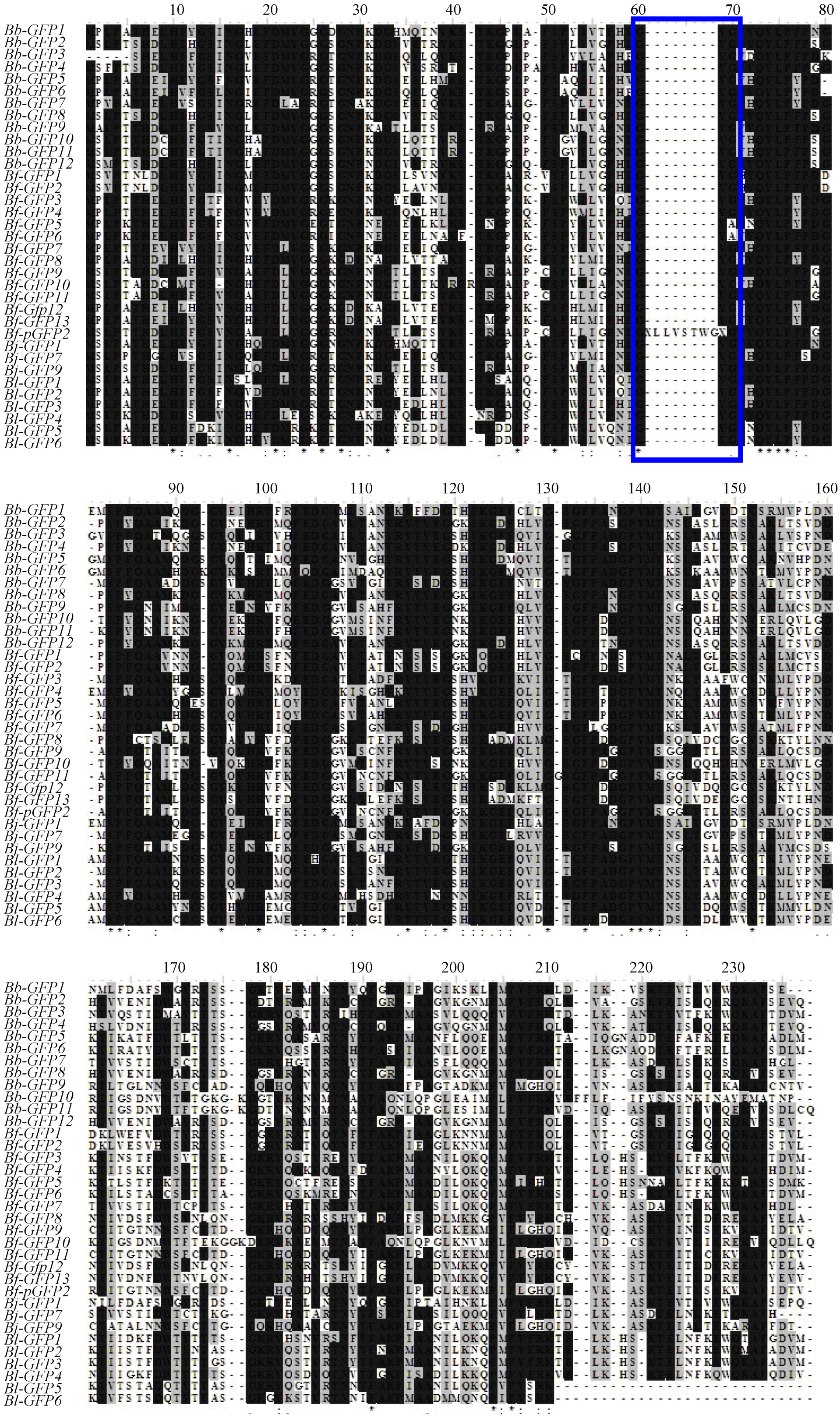

图 1 4 种文昌鱼 35 个 GFP 蛋白序列的比对

Fig. 1 Alignment of 35 GFP protein sequences in four Amphioxus species

蓝颜色框里的是三肽发色基团 (Tripeptide chromophores are marked with a blue box)。

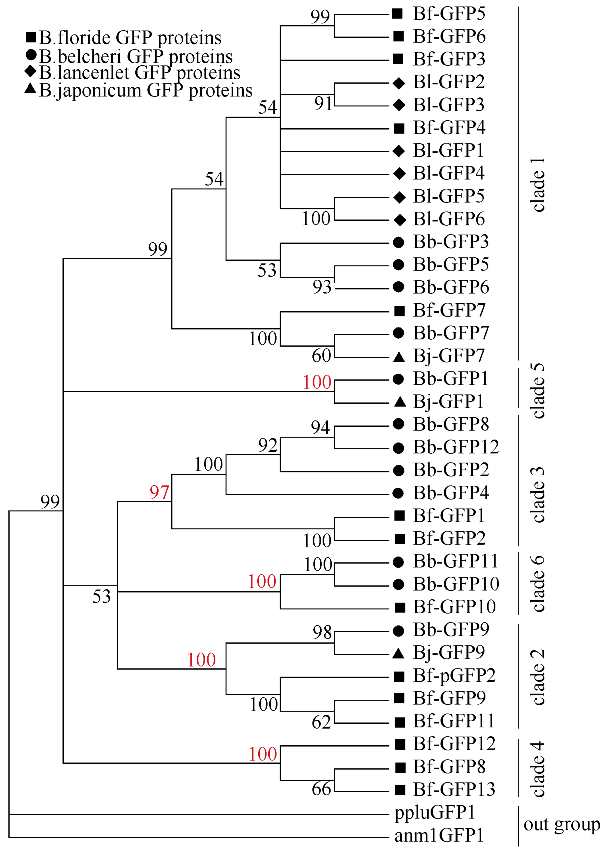

图 2 文昌鱼 GFP 蛋白序列的进化关系

Fig. 2 Phylogenetic relationship of GFP protein sequences in amphioxus

系统进化树由邻接泊松距离法构建, 1 个刺细胞动物和 1 个桡足类动物的 GFP 序列被用于外群, 树图上显示对于不同 GFP 的分类和简称见图上的注释。

The GFP Phylogenetic tree was reconstructed by neighbor-joining method with protein Poisson distances. The sequences from *Cnidaria* and *Copepoda* were used as outgroup. Bootstrap percentages over 50% were shown on the interior branches.

所使用 GFP 序列的序列号如下(GenBank identities for *GFP* genes are as followed)：anm1GFP1, AY485334; ppluGFP1, AY268071; *Bl-GFP1*, EU482388; *Bl-GFP2*, EU482390; *Bl-GFP3*, EU482393; *Bl-GFP4*, EU482400; *Bl-GFP5*, EU482404; *Bl-GFP5*, EU482404; *Bl-GFP6*, EU482405.

10 条曲线的 R^2 值都大于 0.980, 说明标准曲线建立成功。

本实验中 PCR 的检测灵敏度在 10^2～10^3 拷贝/μL, 对于实验的重复性, 我们采用了 *cv* 方法进行重现性评价, 各个引物之间荧光定量PCR的结果排除在实验过程中操作上的失误, 出现的误差很小, 变异系数 1.6%, 说明各组的荧光 PCR 实验结果具有较好的稳定性和重复性, 从而保证了不同样品检测结果的可靠。

2.5 白氏文昌鱼 GFP 基因的表达谱分析

我们对扩增到完整编码区序列的 10 个白氏文昌鱼 GFP 基因在最先有荧光出现的幼鱼 6～8 体节时期、以及荧光信号强烈的成体口笠组织中 GFP 基因的表达进行了定量分析。

2.5.1 GFP 基因在口笠触须中表达的分析 以所得文昌鱼强烈表达荧光的口笠组织 cDNA 为研究对象, 对 10 个 GFP 基因的表达量进行分析(图 3), 结果显示该时期 10 个 GFP 基因均有表达, 但各个基因在该时期的表达丰度差异较大, 在 1.4×10^2～1.7×10^5拷贝/微升之间, 其中 *Bb-GFP7* 的表达量最高, 而 *Bb-GFP9* 最低, 差异达到 1 307 倍。分析发现在该组织中表达丰度较高的 GFP 基因依次为 *Bb-GFP7*、*Bb-GFP3*、*Bb-GFP10*、*Bb-GFP5* 共 4 个 GFP 基因，占该组织中 GFP 基因表达总量的 97.6%, 其中 *Bb-GFP7* 的表达量最高，约占到总量的 57.6%, 其它 GFP 基因表达量相对较低。

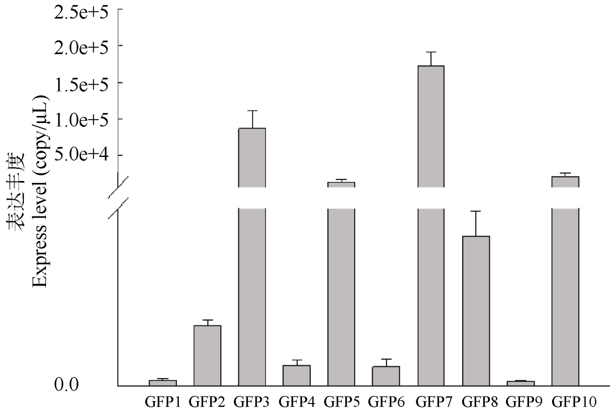

图 3 口笠组织中各 *Bb-GFP* 基因的表达丰度

Fig. 3 Abundance of *Bb-GFP* gene expression on the oral cirri

2.5.2 GFP 基因在 6～8 体节幼体中表达的分析 以刚开始表达荧光的 6～8 体节幼体 cDNA 为分析对象, 对 10 个 GFP 基因的表达量进行分析(图 4), 结果显示该时期 10 个 GFP 基因同样均有表达, 但各个基因在该时期的表达丰度差异较大, 基因的表达量是在 1.5×10^2～6.2×10^5 拷贝/μL 之间, 其中 *Bb-GFP10* 的表达量最高, 而 *Bb-GFP9* 最低, 差异最高达 4 133 倍。分析发现表达量较高的主要是 *Bb-GFP10* 和 *Bb-GFP6*。这 2 个高表达的 GFP 基因，占该组织中 GFP 基因表达总量的 96.0%, 其中 *Bb-GFP10* 的表达量约占到总量的 79.3%, 而其它 GFP 基因则表达量相对较低。

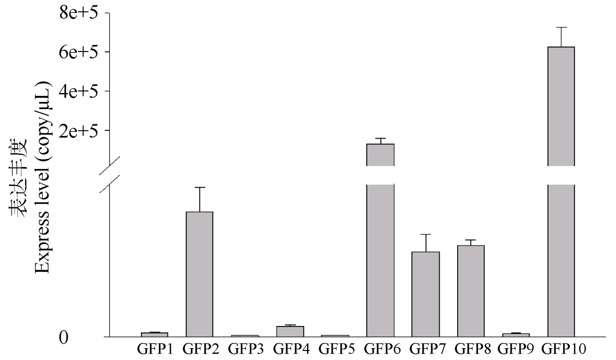

图 4 6~8 体节各 *Bb-GFP* 基因的表达丰度

Fig. 4 Abundance of *Bb-GFP* gene expression on 6-8 somite stages

2.6 绿色荧光在文昌鱼发育时期的变化

为了解不同发育时期文昌鱼绿色荧光的表达规律, 我们用荧光体视镜详细地观察了白氏文昌鱼从刚产出的卵到受精后发育至成体的绿色荧光蛋白表达情况(表 1)。发现文昌鱼卵受精前后均观察不到绿色荧光, 受精卵发育至神经胚早期也没有绿色荧光出现; 神经胚发育至后期, 出膜后的 6～8 体节时期, 在镜下可观察到此时的神经胚发出绿色荧光(77.8%个体会出现), 当发育至 11～13 体节时期, 此时的神经胚已显著延长, 可见全身遍布绿色荧光，而且所有个体都可以见到绿色荧光，只是强弱略有差异; 在 36 h 幼体(3 鳃裂刚开始形成)中绿色荧光呈现不规则分布, 随着个体生长发育, 绿色荧光向身体的前端集中; 幼体发育至第 9 天, 已出现了 5 个鳃裂, 此时在回节环前开始出现较强的绿色荧光(34.2%个体出现)；至第 20 天, 幼体已有 8 鳃裂时, 所有个体在回节环前都出现强烈的绿色荧光, 回节环前的绿色荧光伴随着幼体, 直到幼体变态钻沙, 随着幼体变态的完成，回节环前的绿色荧光才逐渐减弱；完成变态后的亚成体文昌鱼中有 70.8%在口笠处出现较强的绿色荧光, 这种绿色荧光一直伴随着其生长发育。为了对成体文昌鱼的荧光表达

表 1 文昌鱼生长发育各时期荧光表达情况统计

Tab. 1 Statistics of amphioxus individuals with fluorescence expression at different developmental stages

发育时期 Developmental stage	观察总数(个) Total number of amphioxus individuals	荧光强烈表达个体数 Number of individuals with strong fluorescence	荧光微弱表达个体数 Number of individuals with weak fluorescence	无绿色荧光个体数 Number of individuals with no fluorescence	荧光强烈表达个体比例 Proportion of individuals with strong fluorescence (%)
未受精卵 Eggs	176	0	0	176	0
受精卵 Fertilized eggs	247	0	0	187	0
2-16 cell	236	0	0	236	0
32-128 cell	208	0	0	208	0
原肠胚期 Gastrula period	187	0	0	187	0
神经胚期 Neurula stage	157	0	0	157	0
6-8 体节时期 6-8 somites stage	208	105	63	40	50.4
11-13 体节期 11-13 somites period	184	143	41	0	77.8
36 h 幼体 36 h larvae	51	51	0	0	100
3 鳃裂时期 3 gill slits stage	32	32	0	0	100
5 鳃裂时期 5 gill slits stage	35	35(12)*	0	0	100(34.2)
8 鳃裂时期 8 gill slits stage	43	43(43)	0	0	100(100)
37 天变态初期幼鱼 37 days initial metamorphosis larval	37	37(37)	0	0	100(100)
50 天变态完全幼鱼 50 days complete metamorphosis larvae	24	17(14)	7(10)	0	70.8%(58.3%)
86 天亚成体 86 days of Sub-adult	15	6 (0)	9(0)	0(15)	40%(0)
成体 Adult	150	83	67	0	59.2%

*为 5 鳃裂时期到 86 天亚成体的文昌鱼幼鱼在回节环前段出现了强烈表达的绿色荧光, 小括号中的数字代表的是在回节环前端绿色荧光的表达情况。

*: 5 gill slits larvae to 86 sub-adult amphioxus both appeared a strong expression of green fluorescence in the front of the ring. The data of green fluorescent expression in these special areas is represented in parentheses.

情况有个清楚的了解，我们随机选取了 3 批各 50 条成体文昌鱼的荧光表达情况进行观察统计，发现白氏文昌鱼的绿色荧光主要集中在前段，其中荧光表达强烈的位置主要是口笠的基部和触须处，口笠表达强烈绿色荧光和不强烈荧光的比例近似为 6∶4，未发现口笠处完全没有绿色荧光的成体文昌鱼。

3　讨　论

自从 40 年前人们克隆了 *av*GFP 以后，对这个独特家族成员的研究就没有停息，目前对 GFP 荧光发生中起决定作用的生色团形成、光谱学性质和调控的分子机制等生化和光物理学性质已有了较深入的了解。GFP 理化性质上的研究进展及其本身应用的广泛性，使人们对它在起源进化以及功能上的一系列问题产生了浓厚的兴趣。目前很多与 GFP 基因相关的研究成果主要集中在海鞘和桡足类动物的 GFP 上，文昌鱼 GFP 基因的研究工作却没有真正的开展，而作为唯一一个在后口动物体内发现绿色荧光蛋白的文昌鱼，本身就是一个十分令人不解的问题。Deheyn et al (2006)在对 GFP 进化分析时认为，GFP 基因这种在动物界中的稀有且离散分布，可能暗示它与后生动物类群中其他由 11 个标准 *a*-螺旋所构成的 *β*-桶状超蛋白家族有着某些内在的联系，这些蛋白也许并不为我们所熟知，它们只是起着各自的功能，自身也没有耀眼的荧光，例如大多数后生动物细胞外基质重要组成部分的 G2FP 基元蛋白。

先前 Li et al (2009)已经在 3 种不同的文昌鱼体内都发现了 GFP 基因，虽然在具有完整的基因组数据库支持的佛罗里达文昌鱼发现了 13 个 GFP 基因和 2 个假基因，但是欧洲文昌鱼和日本文昌鱼都只得到了少量的 GFP 基因的数据，以致无法对不同种文昌鱼 GFP 基因的直系同源关系给予一个明确的回答，同时也缺乏足够的数据对文昌鱼内的 GFP 基因作一个较完整的系统进化分析。我们在对白氏文昌鱼基因数据库中分析鉴定得到了 12 个 GFP 基因家族的成员，这与 Baumann et al (2008)和 Bomati et al (2009)在对佛罗里达基因组数据库分析时发现的迄今为止最大 GFP 基因家族的结果一致，说明作为唯一一个在后生动物谱系中发现 GFP 基因的物种文昌鱼体内自身确实存在大量的 GFP 基因。随后我们对所有已知的文昌鱼 GFP 进行了系统进化分析，将文昌鱼的 GFP 分为 6 簇，发现已知的 4 种文昌鱼中 GFP 家族并不存在完整的 6 个基因簇，而且不同簇内 GFP 基因的数目也不相同，由此推断现存各种文昌鱼 GFP 基因的多样性是由一个文昌鱼 GFP 基因祖先通过串联倍增来实现的，现存不同种文昌鱼 GFP 基因家族在种间和种内各簇基因数目差别是在后面各自独立的进化过程中发生倍增丢失才出现的，文昌鱼 6 簇 GFP 基因的祖先是在现存所有文昌鱼祖先分化以前就已经存在了。

我们在对 4 种文昌鱼 GFP 基因的蛋白序列比对时发现它们都很显示很高的保守性，而且 *B.b-GFP* 基因的结构和 *B.f-GFP* 基因的结构相同，都是 6~7 个外显子和 5~6 个内含子，每个外显子的大小几乎也都完全相同，这种结构和序列长度上的保守性进一步暗示文昌鱼 GFP 在进化过程中曾受到非常强的选择压力，提示它们在文昌鱼进化过程中可能起着非常重要的作用。通过对两种有基因组数据支持的文昌鱼 GFP 基因结构以及随后的系统进化分析，我们可以更加确定这些 GFP 基因都是来自一个共同的祖先，而不是来自于物种间的水平转移。另外，在对白氏文昌鱼 GFP 和 Li et al.(2009)先前报道的 3 种文昌鱼 GFP 保守的三肽发光基团比较发现，*Bb-GFP* 并没有 *Bf-GFP* 所特有的甘氨酸-酪氨酸-丙氨酸这一特异发色基团。Delagrave et al (1995)和 Wall *e*t al (2000)的研究结果显示第 3 位的甘氨酸在三肽发色团的形成中起着重要的作用，而且在之前所有自然的和人工合成荧光蛋白分析都没有非 XXG 三肽结构发色基团。对有完整基因组数据库支持的 *Bb-GFP* 基因家族的蛋白序列分析结果，进一步明确了 GYA 三肽发色基团是佛罗里达文昌鱼所特有。由此说明，文昌鱼最初的 GFP 并没有在第三个位点是丙氨酸的发色基团，佛罗里达文昌鱼所出现特异发色基团 GYA 可能是在文昌鱼种群分化以后突变的结果。文昌鱼 GFP 蛋白序列在总体上的差异不大，而且几乎所有已知的海鞘和桡足类、以及绝大多数文昌鱼的 GFP 三肽发色集团都是 XYG 结构，但是佛罗里达文昌鱼却在产生荧光起决定作用的发色基团上出现了 GYA 的三肽突变结构，同样也值得我们去深究。

本研究中我们用 RT-PCR 方法在文昌鱼的不同发育时期和不同组织的 cDNA 扩增的到 10 个 GFP 基因的完整蛋白编码区序列，并对这 10 个 GFP 基因在最先有荧光出现的 6~8 体节时期胚胎，以及口笠处荧光表达强烈的成体文昌鱼口笠组织中的表

达量进行分析。结果显示每种 *Bb-GFP* 基因在文昌鱼的不同发育时期都有表达，其中大多数 GFP 基因在文昌鱼体内的表达量较低，但是这些 GFP 基因的表达量并不是一成不变的。那么各种 GFP 基因在不同时期的文昌鱼体内表达量变化呈现什么样的规律，尽管我们对这种变化的认识还不是十分清楚，但是在对以上两个特殊时期 GFP 基因表达量发现高表达的 GFP 基因只有 2~4 个，却占到 GFP 基因表达总量的 96%以上。这与 Bomati et al (2009)和 Li et al (2009)分析佛罗里达文昌鱼不同时期(未受精卵，胚胎和成体)的 EST 数据库发现 97.5%都是由 13 个 GFP 基因中的 2 个贡献的结果基本一致。可见并非所有的 GFP 基因都对文昌鱼的荧光信号起决定作用，一般只有 2~4 个 GFP 基因起主要的作用。

我们还对文昌鱼从卵发育到成体的不同阶段的荧光表达情况进行了系统的观察记录，结果大体上与已有文献的观察结果相似，文昌鱼绿色荧光最先强烈表达都集中在幼体的前端和鳃裂中呈现不规则分布，随后荧光逐渐的集中到成体前端的口笠和触须组织中(Baumann et al, 2008; Bomati et al, 2009; Deheyn et al, 2006; Li et al, 2009; Yu et al, 2004)。不同的是我们在白氏文昌鱼胚胎发育过程中并没有发现文献提到的在受精卵发育到神经胚初期发现的绿色荧光，我们认为造成这种差异一方面可能是物种间的差别；另一方面是我们观察绿色荧光时曝光时间较短，实际上许多物质受激发后都有基础荧光发出，过长的曝光时间显示出来微弱的均匀分布的荧光更大的可能是基础荧光。此外，我们还首次在由 5 鳃裂幼体期发育至刚变态亚成体的过程中发现位于回接环前端有强烈表达的绿色荧光，这种荧光最早出现在 5 鳃裂时期的幼鱼，当 8 鳃裂形成之后普遍可见，之后伴随着幼体的发育过程逐渐增强，直到文昌鱼完成变态形成亚成体后才逐渐减弱，在 86 d 的幼体中进行荧光观察时便已完全消失。这种特异表达强烈荧光在所有文昌鱼的回节环前，而回节环是文昌鱼肝盲囊和肠道的交接位置，这种强烈表达绿色荧光的现象可持续长达 40 多天，可能暗示着个别 GFP 可能在文昌鱼的变态过程和成体器官形成中起着一定的作用。

目前对文昌鱼 GFP 基因的功能缺乏足够的认识，大多与光学相关的功能例如光感受和光保护的作用等，这些结果都是基于水蚤等物种中 GFP 的研究成果。我们对文昌鱼 GFP 基因的表达谱分析以及对不同时期荧光情况的观察和统计，可以清楚看到文昌鱼不同发育时期的荧光表达情况，而且所有 GFP 基因在文昌鱼不同的发育时期都有表达，但并非所有 GFP 基因都对荧光的产生起着决定性作用。以往 Baumann et al (2008)和 Bomati et al (2009)等在对 5 个佛罗里达文昌鱼 GFP 蛋白的光谱学分析结果也显示只有少数 GFP 表达较强的荧光，而绝大多数 GFP 的荧光表达较弱甚至没有表达，这些微弱表达的 GFP 或具有较高的消光系数，或具有很强的抗氧化性，暗示在文昌鱼体内至少有 4 种不同功能类型的 GFP 存在，由此我们推断并不是所有的 GFP 基因都对荧光现象的出现起决定性的作用，在不同的发育时期各种 GFP 基因可能是在行驶各自不同的功能。对于后口动物中第一个发现 GFP 基因的类群——文昌鱼体内内源性 GFP 功能的进一步的研究,可以结合以上所得到的 qPCR 的结果，利用 RNAi 和显微注射基因敲除等一系列方法来研究这些 GFP 基因的生理功能，也可以从蛋白水平对这些 GFP 蛋白的光谱学性质进行深入的研究，同时结合细胞学上的方法对这些基因的表达荧光强度以及荧光半衰期的淬灭等性质进行系统分析，从而为进一步了解 GFP 基因在文昌鱼体内的功能奠定坚实的基础。本研究对文昌鱼 GFP 表达情况的分析都是以经过一年多实验室养殖文昌鱼及其后代为材料，因此，它可能不完全代表在自然界中文昌鱼荧光表达的全部情况。此外，我们通过对文昌鱼的长时间观察,发现文昌鱼生活的环境，例如盐度、光照、渗透压和温度等一系列影响文昌鱼生殖发育的生态因子对于文昌鱼体内绿色荧光蛋白的表达情况的影响，也有待进一步分析研究。

参考文献：

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool[J]. *J Mol Biol,* **215**(3): 403-410.

Baumann D, Cook M, Ma L, Mushegian A, Sanders E, Schwartz J, Yu CR. 2008. A family of GFP-like proteins with different spectral properties in lancelet *Branchiostoma floridae* [J]. *Biol Direct,* **3**(1): 28.

Bomati EK, Manning G, Deheyn DD. 2009. Amphioxus encodes the largest

known family of green fluorescent proteins, which have diversified into distinct functional classes [J]. *BMC Evol Biol,* **9**(1): 77.

Chalfie M, Tu, Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Science,* **263**(5148): 802-805.

Deheyn DD, Kubokawa K, McCarthy JK, Murakami A, Porrachia M, Rouse GW, Holland ND. 2007. Endogenous green fluorescent protein (GFP) in amphioxus [J]. *Biol Bull,* **213**(2): 95-100.

Delagrave S, Hawtin RE, Silva CM, Yang MM, Youvan DC. 1995. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein [J]. *Bio-Technol,* **13**(2): 151-154.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods,* **25**(4): 386-401.

Gurskaya NG, Fradkov AF, Pounkova NI, Staroverov DB, Bulina ME, Yanushevich YG, Labas YA, Lukyanov S, Lukyanov KA. 2003. A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants [J]. *Biochem J,* **373**: 403-408.

Holland LZ, Laudet V, Schubert M. 2004. The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology [J]. *Cell Mol Life Sci,* **61**(18): 2290-2308.

Labas YA, Gurskaya NG, Yanushevich YG, Fradkov AF, Lukyanov KA, Lukyanov SA, Matz MV. 2002. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **99**(9942): 4256-4261.

Li G, Zhang QJ, Zhong J, Wang YQ. 2009. Evolutionary and functional diversity of green fluorescent proteins in cephalochordates [J]. *Gene,* **466**(1): 41-49.

Matz MV, Fradkov AF, Labas, YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species [J]. *Nat Biotechnol,* **17**(10): 969-973.

Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J. 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea [J]. *J Biochemistry,* **13**(12): 2656-2662.

Ong WJH, Alvarez S, Leroux IE , Shahid RS , Samma AA, Peshkepija P, Morgan AL, Mulcahy S, Zimmer M. 2011. Function and structure of GFP-like proteins in the protein data bank [J]. *Mol BioSyst,* **7**(4): 984-992.

Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein [J]. *Science,* **273**(5280): 1392-1395.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol,* **4**(4): 406-425.

Shagin DA, Barsova EV, Yanushevich YG, Fradkov AF, Lukyanov KA, Labas YA, Semenova TN, Ugalde JA, Meyers A, Nunez JM, Widder EA, Lukyanov SA, Matz MV. 2004. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity [J]. *Mol Biol Evol,* **21**(5): 841-850.

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* [J]. *J Cell Comp Physiol,* **59**(3): 223-239.

Theodosiou M, Colin A, Schulz J, Laudet V, Peyrieras N, Nicolas JF, Schubert M, Hirsinger E. 2011. Amphioxus spawning behavior in an artificial seawater facility [J]. *J Exp Biol,* **346B**(4): 263-275.

Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein [J]. *Annu Rev Biochem,* **67**(1): 509-544.

Wall MA, Socolich M, Ranganathan R. 2000. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed [J]. *Nat Struct Biol,* **7**(12): 1133-1138.

Wang YQ, Zhang QJ, Lu XM, Zhong J, Sun Y. 2006. Laboratory culturing and acquirement of the second filial generation of amphioxus [J]. *Zool Res*, **27** (6): 631-634.[王义权, 张秋金, 吕小梅, 钟婧, 孙毅. 2006. 文昌鱼的实验室繁育及子二代获得[J]. 动物学研究，**27** (6): 631-634.]

Yang F, Moss GL, Phillips GN Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein [J]. *Nat Biotechnol,* **14**(10): 1246-1251.

Yu JK, Holland ND, Holland LZ. 2004. Tissue-specific expression of *FoxD* reporter constructs in amphioxus embryos [J]. *Dev Biol,* **274**(2): 452-461.

Zhang QJ, Zhang QJ, Zhong J, Fang SH, Wang YQ. 2006. Branchiostoma japonicum and B. belcheri are distinct lancelets (*Cephalochordata*) in Xiamen waters in China [J]. *Zool Sci,* **23**(6): 573-579.

Zimmer M. 2002. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure and related photophysical behavior [J]. *Chem Rev,* **102**(3): 759-781.